

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-508831

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)10月6日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 49/00		A 9051-4C	
47/34		B 7433-4C	
49/00		Z 9051-4C	
C 0 8 G 63/66	N L P	7107-4J	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-501366  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)6月25日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)12月27日  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR92/00581  
 (87) 国際公開番号 WO93/00101  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)1月7日  
 (31) 優先権主張番号 91/08041  
 (32) 優先日 1991年6月28日  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, FI, JP, NO, US

(71) 出願人 ローネー・ブーラン・ロレ・ソシエテ・アノニム  
 フランス国92160アントニイ・アベニュー・レイモンドアロン20  
 (72) 発明者 スパナル・オエ, ジル  
 フランス国94230カシヤン・アベニュー・クーザン・ドゥ・メリクール4  
 (72) 発明者 バジル, デイ・ディエ  
 フランス国94210ラバヌサン・イレール・リュシユバリエ15ビス  
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

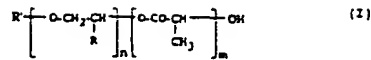
(54) 【発明の名称】 ポリオキシエチレンとポリ乳酸のブロック共重合体を基とするナノ粒子

(57) 【要約】

本発明は、網内細胞系によって捕捉されるまでの時間を引き伸ばすナノ粒子を開示する。上記粒子は、任意にポリ乳酸系ポリマーと混合されていてもよいエチレンおよび/またはプロピレンのポリオキシドとポリ乳酸系のコポリマーで出来ている。

## 請求の範囲

## 1. 式



[式中、

Rは、アルキレンオキサイド単位の各々において、水素またはメチル基から選択される同一もしくは異なる基を表し、

R'は、水素を表すか又は1から4個の炭素原子を有するアルキル基を表し、

nは、20から1000の整数であり、

mは、10から1500の整数である]

で表される単位を主要量で含んでいるポリ(エチレンオキサイド)および/またはポリ(プロピレンオキサイド)ポリ乳酸系共重合体を含んでいることを特徴とする、膜内細胞系を回避するナノ粒子。

2. 請求の範囲1記載の共重合体と1種以上のポリ乳酸系ポリマー(膜)との混合物を含んでいることを特徴とする、請求の範囲1記載のナノ粒子。

3. 請求の範囲2記載のポリマー類と高活性要素との混合物を含んでいることを特徴とする、請求の範囲2記載のナノ粒子。

4. 式(1)中、

Rが水素を表し、

R'がメチル基を表し、

## 明 細 書

ポリオキシエチレンとポリ乳酸のブロック共重合体を基とするナノ粒子

本発明は、しばしば500nm未満の、新規な小型球形粒子に関する。本発明のこの新規な粒子【ナノ粒子(nanoparticles)とも呼ぶ】は、毛細管の中で大きさの問題を生じることなく血液流の中を簡単に導く利点を有していると共に、膜内細胞系を回避(evade)し得る更に一層の利点を有している。本発明はまた、人または動物薬学における本発明に従う新規粒子の使用にも関する。

生きている系の中に注入する目的で用いられ得るナノ粒子は生適合性を示す必要がある。従って、生分解性もしくは生吸収性を示すポリマー類を含んでいない全てのポリマー系は、このような注入では好まれない。更に、上記系を用いる場合、その分解生成物は、生きている有機体に適合性を示すのが好適である。今日まで、適切であり得るポリマーは2種類のみであり、それらは、乳酸系もしくはグリコール酸系ポリマー類または乳酸系-グリコール酸系の混合共重合体である。

ナノ粒子の製造方法は下記の3種類の方法に分類され得る、即ちその1番目の方法は、モノマー類を重合させると同時にナノ粒子を生じさせることにあり、そして他の2つの方法は、このポリマーを溶解させそして独立してナノ粒子を生じさせることにある。

この1番目の種類の方法は、溶液内でモノマーを重合させることにより、この溶液の中で皆のポリマーのミセル状分散を生じさせることにある。この種類の方法は、溶液の中で重合し得るモノマー類に限定されており、そしてこれは、その重合段階の後、その重合媒体、低分子量の

nが20から150であり、

mが10から150である。

ことを特徴とする、前請求の範囲いずれか1項記載のナノ粒子。

5. 50から500nmの平均サイズを有することを特徴とする、前請求の範囲いずれか1項記載のナノ粒子。

6. 50から250nmの平均サイズを有することを特徴とする、前請求の範囲5記載のナノ粒子。

7. 人または動物薬学または医学診断(画像化)における、前請求の範囲いずれか1項記載ナノ粒子の使用。

オリゴマー類、モノマー類、およびこの重合に必要な界面活性剤を除去することが必要とされている。得られるポリマーはランダムな分子量分布を有している。

その2番目および3番目の種類の方法は、予め生じさせたポリマー類を用い、それらを溶液の中に溶解させ、そしてこれらのポリマー類の溶液と非溶液とから沈殿物もしくは分散液を生じさせた後、この溶液を蒸発させて除去することにより、そのナノ粒子をコロイド状分散の形態で回収することにある。この溶液は、一般に、このポリマーの有機溶液であり、そしてその非溶液はしばしば水溶液である。

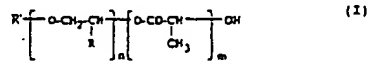
この2番目の種類の方法に従い、そのポリマーを水相性を示す有機溶液の中に溶解させる。この溶液を水相と混合すると、その水相に不溶なポリマー、即ちその水相/有機溶液混合物に不溶なポリマーがナノ粒子の形態で沈殿して来る。

その3番目の種類の方法に従い、そのポリマーが入っている、水に混和性を示さない有機溶液を、水相の中に乳化させた後、この有機溶液を蒸発させて除去する。

この沈殿物またはエマルジョンを生じさせるには、かなりの量の界面活性剤を存在させることが必要である。ここで、その得られるナノ粒子のコロイド状態溶液の中に残存している界面活性剤を、その後行う蒸発処理の間に除去するのは非常に困難であるが、このような界面活性剤は、良好な生適合性に関してしばしば望ましくないものである。このように、この後2つの技術ではコロイド状態の界面活性剤が存在していることから、これらを生適合性を示すナノ粒子の製造で用いるのは不可能である。

本発明は、分解性を示す単位を主要量で含んでいるポリマーを基とし

ており、そして任意に全く追加的界面活性剤を含んでいない、膜内細胞系を回避する新規なナノ粒子に關する。これらは、主要量のポリ乳酸系単位と少量のエチレンオキサイドおよび/またはプロピレンオキサイド単位を含んでいる共重合体から得られる。この共重合体は、好適には、その単位の主要部分に關して、下記の式(1)



(式中、

Rは、アルキレンオキサイド単位の各々において、水素またはメチル基から選択される同一もしくは異なる基を表し、

R'は、水素を表すか或は1から4個の炭素原子を有するアルキル基、好適にはメチル基を表し、

nは、20から10000の整数であり、

mは、10から1500の整数である)

に相当している。

式(1)で表されるこの共重合体のポリ乳酸系ポリマー単位は、好適には700から100,000の分子量を有しており、その部分に關するポリ(エチレンオキサイド)単位は、好適には1,000から40,000の分子量を有している。更に好適には、このポリ乳酸系ポリマー単位は、1,000から60,000の分子量を有しており、そしてそのポリ(エチレンオキサイド)単位は1,000から6,000の分子量を有している。

なポリ乳酸系ポリマー(類)と式(1)で表される共重合体との混合物を含んでいてもよい。

本発明に従う後述の新規ナノ粒子を製造するためには、式(1)で表される共重合体と適当量のポリ乳酸系ポリマーとを混合する必要がある。このポリ乳酸系ポリマーは、好適には、乳酸のDおよびL異性体の50:50混合物を含んでいるポリマー(PLA<sub>50</sub>)である。このポリ乳酸系ポリマーに対して10から80重量%の量で式(1)で表される共重合体を含んでいる混合物を用いるのが好適である。このポリマー組成物内の、ポリ(エチレンオキサイド)および/またはポリ(プロピレンオキサイド)単位とポリ乳酸系単位との間の最終的な重量比は、好適には1から25重量%である。Rが水素を表しnが48に等しくそしてmが133に等しい式(1)で表される共重合体と分子量が60,000のポリ乳酸系ポリマーとを混合することによって得られる組成物を用いるのが最も特に好適である。

これらのナノ粒子を製造する1番目の方法に従い、任意にポリ乳酸系ポリマーと混合した、所望のポリ(エチレンオキサイド)および/またはポリ(プロピレンオキサイド)ポリ乳酸系共重合体を、溶媒または希釈混合物の中に溶解させた後、この有機溶媒を水溶液の中に注ぎ込む結果としての沈殿により、ナノ粒子を生じさせる。この方法では、任意に、追加的コロイド保護剤を全く使用しない。コロイド保護剤は、コロイドの生成を促進する界面活性剤を含む、界面活性を示す薬剤を意味していると理解される。

この共重合体を可溶化する溶媒または希釈混合物は、ケトン類、例えばアセトンなど、環状エーテル類、例えばテトラヒドロフランおよびジ

最終的な好適さに従い、このポリ乳酸系ポリマーは、含まれている乳酸系単位の50%がD構造であるポリマー(PLA<sub>50</sub>)であり、そしてそのポリ(アルキレンオキサイド)はポリ(エチレンオキサイド)である。

この共重合体は、好適には、ジブロックの形態を取っている、即ち進行の真線様式に従い、この出発材料は、所望分子量、即ち1,000から40,000の分子量を有するか、或は二重択一的に20から1,000個のエチレンオキサイドまたはプロピレンオキサイド単位、好適には20から150個のエチレンオキサイド単位か或は20から100個のプロピレンオキサイド単位を含んでいる、市販の単官能ポリ(エチレンオキサイド)および/またはポリ(プロピレンオキサイド)であり、これの上に、出発材料であるラクチド単位を、開始剤、例えば特にカプリル酸などの存在下、そのポリ乳酸系に關して所望の分子量が得られるまでグラフト化する。

1,000から60,000の分子量を有するポリ乳酸系ブロックを得るためには約10から1,000個のラクチド単位を導入するのが望ましいことを指摘することができる。その量が10から150個の乳酸系単位を含んでいるポリ乳酸系ポリ(エチレンオキサイド)、および/またはポリ(プロピレンオキサイド)共重合体を用いるのが最も特に好適である。

48個のエチレンオキサイド単位を含んでいる、分子量が2,100の市販ポリエチレングリコールを用いて出発し、これと40から150個のラクチド単位とを反応させるのが、更に特に好適である。

膜内細胞系を回避するこれらの新規ナノ粒子はまた、1種以上の純粋

オキサン類など、並びにニトリル類、例えばアセトニトリルなどから選択される。アセトンを用いるのが好適である。これらの溶媒への該共重合体の溶解度は、好適には10g/L以上である。

この水溶液は純粋な水であるか、或は塩溶液、例えば緩衝液であるか、或は二重択一的にグルコース溶液であってもよい。

この水溶液と該共重合体溶液との体積比は、好適には0.5から10最も特別には1から10である。この溶媒の中に導入する共重合体量は、自然と、その溶解度に依存しているが、本発明の改良された進行に關しては、即ち本質的に、生じてきたナノ粒子を最適収量で得るためには、10から50mg/mLの量が好適である。

これらのナノ粒子を製造する2番目の方法に従い、このポリ(エチレンオキサイド)および/またはポリ(プロピレンオキサイド)ポリ乳酸系ポリマーを、エステル、好適には酢酸エチルの中に溶解させた後、この有機溶媒を水溶液の中に注ぎ込む。ミクロフュージダイザー(microfluidiser)を用いることでこれらのナノ粒子を生じさせる。

次に、このナノ粒子のコロイド溶液を、この溶液除去を大気圧下で行う場合その溶液の沸点以上の温度に加熱するか、或はこの溶液を減圧下で行う場合それより低い温度に加熱することによって、その共重合体の溶液を蒸発させて除去する。この溶液を除去した後、水中のナノ粒子懸濁液を、孔径径が約1μmのフィルターで濾過することにより、凝集物および巨大粒子を除去する。得られるナノ粒子の収率は一般に50%以上である。

この共重合体の溶液の中か或はその沈殿物溶液の中に導入され得る異性活性要素の存在下で、該ナノ粒子を生じさせてもよく、この要素は、

好適にはこのポリマーの溶解に溶解性を示すと共に水に不溶であるべきであるが、この活性要素が水に不溶である場合、これがナノ粒子を形成することもあり得るが、その収率は低下するであろう。

得られるナノ粒子は、式(1)で表される共重合体ののみを含んでいるか、或は式(1)で表される共重合体とポリ乳酸系ポリマー類との混合物を含んでおり、そして任意に、その沈殿を活性要素の存在下で行う場合、その活性要素を含んでいる。これらの平均粒径は50から500nm、好適には50から250nmである。

得られるナノ粒子の必須利点は、それらが体内細胞系を回避し得る点であることから、生きている有機体への注入で用いられる、即ち、それらの主要な用途は、人または動物医学分野であるか、或は医学診断法の目的で用いられる。これらの製品は、過敏反応の危険なしに、筋肉内、皮下、動脈内または静脈内注射で患者または空腔の中に注入される。

本発明を制限することを意図するものでない以下の実施例を用いて、本発明をより完全に記述する。

#### 実施例1

ポリエチレングリコールポリ乳酸系共重合体の製造

##### 1. 1) ポリマー P(LA)<sup>9000</sup>-PEG<sup>1000</sup>

かい型反応槽と連続コンデンサが備わっており、乾燥窒素流下中であり、そして温度調節されているオイルバス上で加熱されている、250mLの3つ口丸底フラスコの中に、下記を導入する：

D-レーラクチド	144g
ポリエチレングリコール	79.3g
カプリル酸第一級	0.256g

カプリル酸第一級 0.085g

重留トルエン 90g

を導入して実施例1.1を繰り返す。

反応後、63.6gの凝縮物が得られ、この凝縮物を下記の方法で精製する。均一な溶液が得られるまで、40gの凝縮物を200gのジクロロメタンの中に溶解させる。この溶液を、55から60℃に維持されている水800mLの中にゆっくりと注ぎ込む。このポリマーを沈殿させ、そしてそのジクロロメタンを蒸発させて除去すると、その未反応のラクチドは水層の中に残存しており、このポリマーを遠心分離にかけた後、40℃の減圧下オープン内で乾燥する。

35gのポリマーが得られ、数値共鳴を用いた分析により、この分子量を測定することができる。この分子量は、その乳酸系単位に関して9,600でありそしてポリ(ポリエチレンオキサイド)鎖に関して2,100であり、このことは、乳酸系単位が133個でありそしてエチレンオキサイド単位が48個であることを表している。

##### 1. 3) ポリマー P(LA)<sup>9000</sup>

いかり型反応槽と連続コンデンサが備わっておりそして窒素下に維持されている、オイルバス上で加熱されている、1リットルの反応槽の中に、使用前に重留したキシレン180mgとカプリル酸0.180gを導入し、この混合物を加熱した後、予め酢酸エチル中で再結晶しそして酢酸エチルで洗浄したBoehringer会社製D-レーラクチドSを120g導入した。

この混合物を140℃で5時間反応させ、そしてこの反応が終了した時点で、これを急速冷却した後、このキシレンの一部を真空下で除去す

重留トルエン

335g。

このラクチドは、その翌日に酢酸エチルの中で再結晶させた後、その日にそれ自身をエチルエーテルで洗浄し、真空下で乾燥したものである。これらの全ての反応体を仕込んだ後、この混合物を穏やかな温度(110-114℃)下で5時間加熱する。次に、ロータリーエバポレーター(40mmHg-100℃)を用いてその溶液を真空下で除去する。

226.3gの凝縮物が得られる。

この共重合体の精製を下記の様式で行う。

下記のものを仕込む：

凝縮物	215g
ジクロロメタン	280g。

均一な溶液が得られるまでこの混合物を攪拌する。この溶液を900mLのヘキサンの中にその冷却した状態でゆっくりと注ぎ込む。このポリマーはペーストの状態で沈殿し、これを沈降させたあと分離する。そのヘキサン相の中に存在している重合性除去する。このポリマーを分離した後、このポリマーを40℃の減圧オープン内で乾燥する。18.8.4gの共重合体を得られ、この質量を数値共鳴で分析した結果、ポリエチレングリコールの質量は2,100でありそしてポリ乳酸系のそれは2,900であり、このことは、乳酸系単位が40個でありそしてエチレンオキサイド単位が48個であることを表している。

##### 1. 2) ポリマー P(LA)<sup>9000</sup>-PEG<sup>1000</sup>

下記の化合物：

D-レーラクチド	48.6g
ポリエチレングリコール	10g

る。このポリマーをジクロロメタンの中に溶解させた後、メタノールで沈降させる。これを65℃の真空オープン内で乾燥する。

#### 実施例2

1番目の製造方法を用いた、上記ポリマー類からのナノ粒子製造

1. 1で製造した共重合体と、1. 3に言うポリ乳酸系ポリマーと、分子量が18,000の炭素-14-標識ポリ乳酸系ポリマーとの混合物(下記の表に従う)を50mg用い、これを5mLのアセトンの中に溶解させる。同じポリ乳酸系ポリマーを用いているコロイド分散剤を存在させる従来技術に従って調製したナノ粒子、即ちPluronic F68またはPoloxamer 188を用いて比較実験を行う。これらのナノ粒子は、5mLの0.13規定硝酸塩緩衝液(pH7.4)の中に上記量をゆっくりと注ぎ込むことによる沈降で調製したものである。この得られるコロイド懸濁液を、ロータリーエバポレーターにより、3mmHgの圧力下で30分間蒸発させる。次に、大きな粒子と凝集物を除去する目的で、この懸濁液を1.2μmのフィルターで濾過する。

この懸濁液の400μLを各々のラットに注射し、そしてこれらのラットを5匹ずつのグループに分け、その1つは、ポリ(エチレンオキサイド)濃度各々のためのものである。標識の終点でその血液の中に存在している放射線のα%として、その血液中に残存している放射線を時間の関数としてプロットすることにより、体内細胞系による該粒子の吸収速度を表す。導入したポリエチレングリコール量の関数として、該粒子の半減期を以下の表の示す。この血液の中に残存している放射線を表すグラフも添付する。

特表平6-508831 (5)

水中 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の濃度のコラーゲンナトリウム溶液である。これらのナノ粒子の直径は $105 \pm 45\text{ nm}$ であり、半減期は0.5時間である。

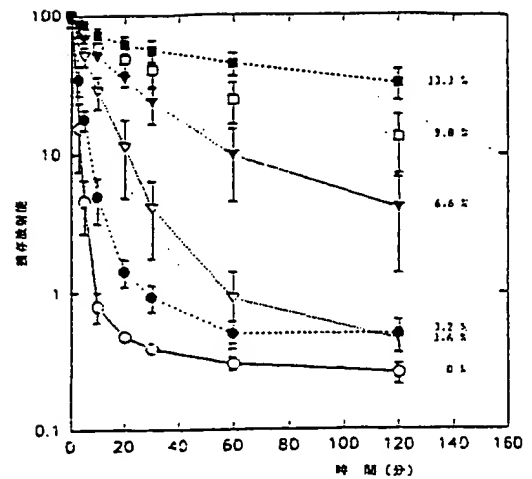
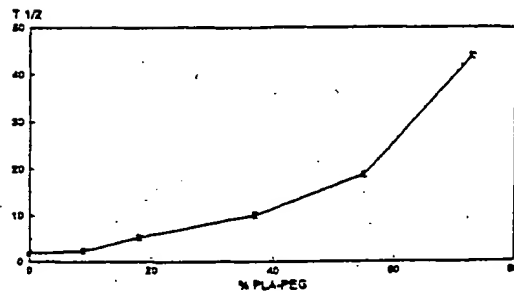
% PEG	0	0	1.6	3.2	6.6	9.8	13.1
PLA <sup>14</sup> C-PEG <sup>3</sup> H <sup>3</sup>	0	0	9	18	37	55	73
PLA <sup>14</sup> C	70	0	61	55	36	18	0
<sup>14</sup> C-PLA <sup>14</sup> C	30	100	20	27	27	27	27
界面活性剤 F68 50 g/l	YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T <sub>1/2</sub> (分)	1.9	1.8	2.3	5.2	10.0	18.7	43

2番目の製造方法による、上記ポリマー類からのナノ粒子製造  
(界面活性剤なし)

PLA<sub>66</sub><sup>14</sup>C-PEG<sup>3</sup>H<sup>3</sup>を100mg、そして分子量が18,000の<sup>14</sup>C標識ポリ(DL-乳酸)を10mg用い、これらを1mLの酢酸エチルの中に溶解させる。次に、Ultraturraxを用い、上記溶液を10mLの水の中に分散させる。粗エマルジョンが得られる。次に、これを、MICROFLUIDICS型高圧ホモジェナイザーを用いて2分間再分散させる。ロータリーエバポレーターを用い、50.5cmの水蒸気圧下20℃で、このエマルジョンから酢酸エチルを除去する。この得られる微ラテックスは、平均直径が $145 \pm 60\text{ nm}$ のナノ粒子を含んでいる。血液内での上記ナノ粒子の半減期は1時間である。

(界面活性剤使用)

この操作は上の実験例と同じであるが、PLA<sup>14</sup>C-PEG<sup>3</sup>H<sup>3</sup>を500mg、PLA<sub>66</sub><sup>14</sup>Cを50mgそして<sup>14</sup>C標識PLA<sub>66</sub><sup>14</sup>Cを10mg用い、これらを1mLの酢酸エチルの中に溶解させる。この水相は、



[illegible]

Print Name (last & service name)	Print Name (last & service name)	Print Name (last & service name)	Print Name (last & service name)
WD-A- 7800011	23-12-78	EA-A- 000553	23-01-80

(72) 発明者 ベイヤール、ミシエル  
フランス国92330ソ・リュデュドクトウ  
ールールー12

(72) 発明者    ブリウドム、クリスチャン  
                 フランス国69006リヨン・リュコマダン  
                 フォラ19

(72) 発明者    ミシヤロン、ジャン・ポール  
                 フランス国69008リヨン・リュサンマチュ  
                 ー52



DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

Numéro de dépôt : 92401788.2

Int. Cl.<sup>5</sup> : A61K 31/765, A61K 9/51,  
A61K 47/34

Date de dépôt : 25.06.92

Priorité : 28.06.91 FR 9108041

Date de publication de la demande :  
30.12.92 Bulletin 92/53

Etats contractants désignés :  
PT

Demandeur : RHONE-POULENC RORER SA  
20, avenue Raymond Aron  
F-92160 Antony (FR)

Inventeur : Spentehauer, Gilles  
10 Place Ovale  
F-94230 Cachan (FR)

Inventeur : Bazile, Didier  
 15 bis rue Chevalier  
 F-94210 La Varenne St. Hilaire (FR)  
 Inventeur : Vellard, Michel  
 12 rue du Docteur Roux  
 F-92330 Sceaux (FR)  
 Inventeur : Prud'homme, Christian  
 19 rue Commandant Faurax  
 F-69006 Lyon (FR)  
 Inventeur : Michalon, Jean-Paul  
 52 rue St. Mathieu  
 F-69008 Lyon (FR)

Mandataire : Le Pennec, Magali et al  
 RHONE-POULENC RORER SA, Direction des  
 Brevets, 20 Avenue Raymond Aron  
 F-92165 Antony Cédex (FR)

Nanoparticules à base d'un copolymère à blocs de polyoxyde d'éthylène et acide polylactique.

La présente invention concerne des nanoparticules ayant un temps de capture, par le système réticulo endothélial, allongé. Elles sont constituées d'un copolymère polylactique polyoxyde d'éthylène et/ou de propylène éventuellement en mélange avec un polymère polylactique.

La présente invention concerne de nouvelles particules sphériques de petites dimensions, souvent inférieures à 500 nm. Les nouvelles particules de la présente invention, encore appelées nanoparticules présentent l'avantage de pouvoir circuler dans le flux sanguin sans problème de dimension au niveau des capillaires et présentent en plus l'avantage de pouvoir éviter le système réticulo endothélial. L'invention vise aussi l'utilisation des nouvelles particules selon l'invention en pharmacie humaine ou animale.

Les nanoparticules qui peuvent être utilisées pour une injection dans le système vivant doivent être biocompatibles. Ainsi tous les systèmes polymériques ne contenant pas de chaînes polymériques biodégradables ou biorésorbables ne sont pas acceptables pour de telles injections. Il est d'autre part préférable lorsque l'on utilise de tels systèmes que les produits de dégradation soient compatibles avec les organismes vivants. A ce jour seulement deux types de polymères peuvent convenir, il s'agit des polymères lactiques ou glycoliques ou des copolymères mixtes lactique-glycolique.

Les procédés de préparation des nanoparticules peuvent être divisés en trois types de procédé, le premier consistant à polymériser les monomères et à armer les nanoparticules simultanément, les deux autres consistant à solubiliser le polymère et à former les nanoparticules indépendamment.

Le premier type de procédé consiste à effectuer une polymérisation d'un monomère dans une solution de façon à obtenir une dispersion micellaire du polymère dans la solution. Ce type de procédé est limité à des monomères polymérisables en solution, il nécessite l'élimination après l'étape de polymérisation du catalyseur de polymérisation, des oligomères de bas poids moléculaire, des monomères et des agents surfactants nécessaires à la polymérisation. Le polymère obtenu présente une répartition de poids moléculaire aléatoire.

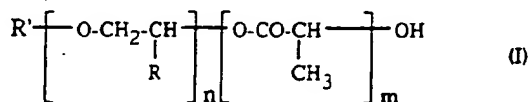
Le deuxième et le troisième types de procédé consistent à utiliser des polymères préformés, à les solubiliser dans un solvant, à former un précipité ou une dispersion à partir d'une solution de ces polymères et d'un non solvant puis à évaporer le solvant de façon à récupérer les nanoparticules sous forme d'une suspension colloïdale. La solution solvante est généralement une solution organique du polymère, la solution non solvante est souvent une solution aqueuse.

Selon le deuxième type de procédé, le polymère est solubilisé dans un solvant organique miscible à l'eau. Lorsque cette solution est mélangée à la phase aqueuse, le polymère insoluble dans le mélange phase aqueuse/solvant organique précipite sous forme de nanoparticules.

Selon le troisième type de procédé on émulsionne le solvant organique contenant le polymère, non miscible à l'eau, dans une phase aqueuse puis on évapore le solvant organique.

La formation du précipité ou de l'émulsion exige la présence d'une quantité d'agent surfactant loin d'être négligeable. Or lors de l'évaporation subséquente, il est très difficile d'éliminer l'agent surfactant qui subsiste dans la suspension colloïdale de nanoparticules obtenue, cet agent est souvent indésirable pour une bonne biocompatibilité. Ces deux dernières techniques ne sont donc pas utilisables pour la préparation de nanoparticules biocompatibles à cause de la présence de l'agent protecteur colloïdal.

La présente invention concerne de nouvelles nanoparticules évitant le système réticulo endothélial à base de polymères comportant une majorité de motifs dégradables et ne contenant éventuellement pas d'agent tensioactif additionnel. Elle sont obtenues à partir d'un copolymère constitué d'une majorité de motifs polylactiques et d'une minorité de motifs oxyde d'éthylène et/ou oxyde de propylène. Ce copolymère répond pour la majorité de ses motifs de préférence à la formule (I) suivante :



dans laquelle:

R représente dans chacun des motifs oxyde d'alkylène un groupe identique ou différent choisi parmi l'hydrogène ou un groupe méthyle

R' représente l'hydrogène ou un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, de préférence un groupe méthyle

n est un nombre entier compris entre 20 et 1000

m est un nombre entier compris entre 10 et 1500

Le motif polymérique polylactique de ce copolymère de formule (I) a de préférence un poids moléculaire compris entre 700 et 100 000, le motif polyoxyde d'éthylène a lui de préférence un poids moléculaire compris entre 1 000 et 40 000. D'une façon encore plus préférentielle le motif polymérique polylactique a un poids moléculaire compris entre 1 000 et 60 000, le motif polyoxyde d'éthylène a un poids moléculaire compris entre 1 000 et 6 000.



Selon une dernière préférence le polymère polylactique est un polymère contenant 50 % de motifs lactique de configuration D (PLA<sub>50</sub>) et le polyoxyde d'alkylène est un polyoxyde d'éthylène.

Ce copolymère se présente de préférence sous une forme dibloc, c'est à dire que selon une manière pratique de mise en oeuvre on part d'un polyéthylène et/ou polyoxyde de propylène commercial monofonctionnel de poids moléculaire désiré c'est à dire d'un poids moléculaire compris entre 1000 et 40 000 ou encore comportant 20 à 1000 motifs oxyde d'éthylène ou de propylène, de préférence comportant 20 à 150 motifs oxyde d'éthylène ou 20 à 100 motifs oxyde de propylène sur lequel on greffe des motifs lactides jusqu'à obtenir le poids moléculaire désiré sur la chaîne polylactique en présence d'un initiateur tel que notamment l'octoate d'étain.

On peut préciser que pour obtenir des blocs polylactiques d'un poids moléculaire compris entre 1 000 et 60 000, il est souhaitable d'introduire entre environ 10 et 1000 motifs lactide. On préfère tout particulièrement utiliser des copolymères polyoxyde d'éthylène et/ou polyoxyde de propylène polylactique dont la chaîne contient entre 10 et 150 motifs lactiques.

On préfère encore plus particulièrement partir d'un polyéthylène glycol commercial comportant 48 motifs oxyde d'éthylène d'un poids moléculaire de 2100 que l'on fait réagir avec 40 à 150 motifs lactide.

Ces nouvelles nanoparticules évitant le système réticulo endothélial peuvent aussi être constituées d'un mélange d'un ou de plusieurs polymère(s) polylactique pur et du copolymère de formule (I).

Afin de préparer ces dernières nouvelles nanoparticules selon l'invention il est nécessaire de mélanger le copolymère de formule (I) avec une quantité utile d'un polymère polylactique. Ce polymère polylactique est de préférence un polymère comportant un mélange 50/50 d'isomère D et L de l'acide lactique (PLA<sub>50</sub>). On préfère utiliser un mélange contenant entre 10 et 80 % en poids de copolymère de formule (I) par rapport au polymère polylactique. Le rapport pondéral final dans la composition polymérique entre le motif polyoxyde d'éthylène et/ou de propylène et les motifs polylactique est de préférence compris entre 1 et 25 % en poids. On préfère tout particulièrement utiliser la composition obtenue par mélange d'un polymère polylactique de poids moléculaire de 60 000, d'un copolymère de formule (I) dans lequel R représente l'hydrogène, n est égal à 48 et m est égal à 133.

Selon une première méthode de préparation des nanoparticules, le copolymère polylactique-polyoxyde d'éthylène et/ou de propylène désiré, éventuellement en mélange avec le polymère polylactique est mis en solution dans un solvant ou dans un mélange de solvants, puis la solution organique est versée dans une solution aqueuse, de façon à provoquer la formation des nanoparticules par précipitation. Dans ce procédé, on n'utilise éventuellement pas d'agent protecteur colloïdal additionnel. On entend par agent protecteur colloïdal, les agents de surface dont font partie les agents tensioactifs qui favorisent la formation de colloïdes.

Le solvant ou le mélange de solvants solubilisant le copolymère est choisi parmi les cétones telle que l'acétone, les éthers cycliques tels que le tétrahydrofurane, les dioxanes; les nitriles tels que l'acétonitrile. On préfère utiliser l'acétone. La solubilité du copolymère dans ces solvants est de préférence supérieure à 10 g/l.

La solution aqueuse peut être de l'eau pure ou une solution saline telle par exemple une solution tampon ou également une solution de glucose.

Le rapport volumique entre la solution aqueuse et la solution du copolymère est compris de préférence entre 0,5 et 10, et tout particulièrement entre 1 et 10. La quantité de copolymère introduite dans le solvant dépend bien entendu de sa solubilité, mais pour une meilleure mise en oeuvre de l'invention, c'est à dire essentiellement pour obtenir un rendement optimum en nanoparticules formées, une quantité comprise entre 10 et 50 mg/ml est préférée.

Selon une deuxième méthode de préparation des nanoparticules, le polymère polylactique polyoxyde d'éthylène et/ou de propylène est mis en solution dans un ester, de préférence dans l'acétate d'éthyle puis la solution organique est versée dans la solution aqueuse. Les nanoparticules sont formées par l'utilisation d'un microfluidiseur.

Le solvant du copolymère est ensuite évaporé en chauffant la solution colloïdale de nanoparticules au dessus de la température d'ébullition du solvant dans le cas où l'élimination est effectuée à pression atmosphérique ou à une température inférieure si l'évaporation est effectuée sous pression réduite. Après que le solvant ait été éliminé, la suspension de nanoparticules dans l'eau est filtrée sur un filtre de diamètre de pores d'environ 1 µm, de façon à éliminer les agrégats et les grosses particules. Le rendement en nanoparticules obtenues dépasse généralement 50 %.

La formation de nanoparticules peut être effectuée en présence d'un principe actif pharmaceutique qui peut être introduit soit dans le solvant du copolymère soit dans le solvant de précipitation, il doit de préférence être soluble dans le solvant du polymère et non soluble dans l'eau, bien qu'il soit toujours possible de former des nanoparticules si le principe actif est soluble dans l'eau, le rendement en sera néanmoins amoindri.

Les nanoparticules obtenues ne contiennent que le copolymère de formule (I) ou le mélange de polymères polylactiques et de copolymère de formule (I) et éventuellement un principe actif si la précipitation est effectuée

en présence d'un principe actif. Elles présentent un diamètre moyen compris entre 50 et 500 nm et de préférence un diamètre moyen compris entre 50 et 250 nm.

Les nanoparticules obtenues sont utilisées pour des injections dans un organisme vivant dans la mesure où leur avantage essentiel est de pouvoir éviter le système réticulo endothélial, ainsi leur application principale se trouve en pharmacie humaine ou animale. ou pour le diagnostic médical. Ces produits sont injectables par voie intramusculaire, sous cutanée, intraartérielle, intraveineuse, intraorgane ou intracavités sans risque anaphylactique

L'invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants qui ne doivent pas être considérés comme limitatifs de l'invention.

#### EXEMPLE 1

##### Préparation de copolymères polylactique polyéthylène glycol

##### 1.1) polymère PLA<sup>2900</sup> - PEG<sup>2100</sup>

Dans un ballon tricol de 250 ml muni d'un agitateur à palettes et d'un réfrigérant ascendant avec circulation d'azote sec, le ballon étant chauffé par un bain d'huile régulé, on introduit :

dl lactide	144 g
polyéthylène glycol	79.3 g
octoate stanneux	0.256 g
toluène distillé	335 g

Le lactide est recristallisé la veille dans l'acétate d'éthyle, puis lavé le jour même à l'éther éthylique. On le sèche sous vide. On charge tous les réactifs puis on chauffe sous léger reflux (110-114°C) pendant 5 heures et demi. Le solvant est ensuite éliminé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (40 mm de Hg - 100°C).

On obtient 226.3 g de concentrat.

La purification du copolymère est effectuée de la façon suivante :

On charge:

concentrat	215 g
dichlorométhane	280 g

On agite jusqu'à formation d'une solution homogène. Cette solution est coulée lentement dans 900 ml d'hexane à froid. Le polymère précipite sous forme d'une pâte qui est séparée par décantation. Le catalyseur de polymérisation est éliminé dans la phase hexanique. Après séparation du polymère il est mis à sécher dans une étuve sous vide à 40 °C. On obtient 188.4 g de copolymère dont la masse est analysée par résonnance magnétique nucléaire, la masse de polyéthylène glycol est de 2100 et celle de polylactique de 2900, ce qui représente 40 motifs lactique et 48 motifs oxyde d'éthylène

##### 1.2) polymère PLA<sup>9600</sup>-PEG<sup>2100</sup>

On reproduit l'exemple 1.1 en introduisant les composés suivants :

dl lactide	48.6 g
polyéthylène glycol	10 g
octoate stanneux	0.085 g
toluène distillé	90 g

après réaction on obtient 63,6 g de concentrat que l'on purifie par la méthode suivante : on met en solution 40 g de concentrat dans 200 g de dichlorométhane jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Cette solution est versée lentement dans 800 ml d'eau maintenu entre 55 et 60°C. Le polymère précipite et le dichlorométhane est évaporé, le lactide non réagi reste en solution aqueuse, le polymère est centrifugé puis séché à l'étuve sous vide à 40°C.

On obtient 35g de polymère dont l'analyse par résonnance magnétique nucléaire permet de déterminer le poids moléculaire. Ce dernier est de 9600 pour la chaîne lactique et de 2100 pour la chaîne polyoxyde d'éthylène, ce qui représente 133 motifs lactique et 48 motifs oxyde d'éthylène.

##### 1.3) polymère PLA<sup>40000</sup>

55

Dans un réacteur d'un litre chauffé par un bain d'huile et muni d'un agitateur sous forme d'une ancre et d'un réfrigérant ascendant et maintenu sous azote, on introduit 180 g de xylène distillé avant emploi et 0,180 g d'octoate d'étain, on chauffe, puis on introduit 120 g de dl lactide S de la société Boehringer préalablement

recristallisé dans l'acétate d'éthyle et lavé à l'éther sulfurique.

On laisse réagir 5 heures à 140°C, en fin de réaction, on refroidit rapidement puis on élimine une partie du xylène sous vide. On dissout le polymère dans le dichlorométhane et on le précipite par le méthanol. On le sèche dans une étuve à vide à 65°C.

## EXEMPLE 2

### Préparation de nanoparticules à partir de ces polymères par la première méthode de préparation

On utilise 50 mg d'un mélange selon le tableau suivant de copolymère préparé en 1.1, de polymère polylactique selon 1.3 et d'un polymère polylactique de poids moléculaire 18 000 marqué au carbone 14 que l'on dissout dans 5 ml d'acétone. Un essai comparatif est effectuée en utilisant des nanoparticules préparées selon l'art antérieur à partir du même polymère polylactique mais en présence d'un agent protecteur colloïdal qui est le Pluronic F68 ou Poloxamer 188. Les nanoparticules sont préparées par précipitation en versant lentement ce volume dans 5 ml de tampon phosphate 0,13 molaire (pH 7,4). La suspension colloïdale obtenue est évaporée 30 minutes au rotavapor à température ambiante et sous une pression de 3 mm de Hg. La suspension est alors filtrée sur un filtre de 1,2 µm afin d'éliminer les grosses particules et les agrégats.

On injecte à chaque rat 400 µl de suspension, les rats sont répartis en lots de cinq, un pour chaque concentration en polyoxyde d'éthylène. La cinétique de capture des particules par le système réticulo endothélial est représentée en portant la radioactivité restant dans le plasma en % de la radioactivité présente dans le plasma en fin de perfusion en fonction du temps. La demi vie des particules en fonction de la quantité de polyéthylène glycol introduite est indiquée dans le tableau ci-dessous. Les courbes de radioactivité restante dans le plasma sont tracées en annexe.

% PEG	0	0	1.6	3.2	6.6	9.8	13.1
PLA <sup>9600</sup> PEG <sup>2100</sup>	0	0	9	18	37	55	73
PLA <sup>40 000</sup>	70	0	61	55	36	18	0
<sup>14</sup> C PLA <sup>18 000</sup>	30	100	30	27	27	27	27
tensioactif F68 50g/l	OUI	NON	NON	NON	NON	NON	NON
T1/2 vie en mn	1.9	1.8	2.3	5.2	10.0	18.7	43

### Préparation des nanoparticules à partir de ces polymères par la deuxième méthode de préparation

Sans agent tensio-actif.

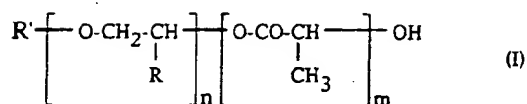
On utilise 100 mg de PLA<sup>9600</sup>PEG<sup>2100</sup> et 10 mg de poly(d,l-acide lactique) de poids moléculaire 18000 marqué au <sup>14</sup>C que l'on dissout dans 1 ml d'acétate d'éthyle. Cette solution est ensuite dispersée à l'aide d'un ultraturrax dans 10 ml d'eau. Une émulsion grossière est obtenue. Elle est ensuite recyclée pendant 2 minutes à l'aide d'un homogénéisateur haute pression type MICROFLUIDICS. L'émulsion est débarrassée de l'acétate d'éthyle à l'aide d'un évaporateur rotatif à une pression de 50.5 cm de mercure à 20°C. Le pseudolatex obtenu est constitué de nanoparticules d'un diamètre moyen de 145 ± 60 nm. La demi-vie de ces nanoparticules dans le sang est de 1 heure.

Avec un agent tensio-actif.

On procède de même que dans l'exemple précédent en dissolvant 50 mg de PLA<sup>9600</sup>PEG<sup>2100</sup>, 50 mg de PLA<sub>41</sub><sup>52000</sup> et 10 mg de PLA<sub>41</sub><sup>18000</sup> marqué au <sup>14</sup>C que l'on dissout dans 1 ml d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est une solution de cholate de sodium à 10 g.l<sup>-1</sup> dans l'eau. Diamètre des nanoparticules: 105 ± 45 nm. Demie-vie: 0.5 heure.

### Revendications

1 - Nanoparticules évitant le système réticulo endothélial caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un copolymère polylactique polyoxyde d'éthylène et/ou de propylène comportant une majorité de motifs de formule :



dans laquelle:

R représente dans chacun des motifs oxyde d'alkylène un groupe identique ou différent choisi parmi l'hydrogène ou un groupe méthyle

R' représente l'hydrogène ou un groupe alkyle contenant 1 à 4 atomes de carbone

n est un nombre entier compris entre 20 et 1000

m est un nombre entier compris entre 10 et 1500.

- 2 - Nanoparticules selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un mélange d'un copolymère selon la revendication 1 et d'un ou plusieurs polymère(s) polylactique.

- 3 - Nanoparticules selon la revendication 2 caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un mélange de polymères selon la revendication 2 et d'un principe actif pharmaceutique.

- 4 - Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisées en ce que dans la formule (I)

R représente l'hydrogène

R' représente un groupe méthyle

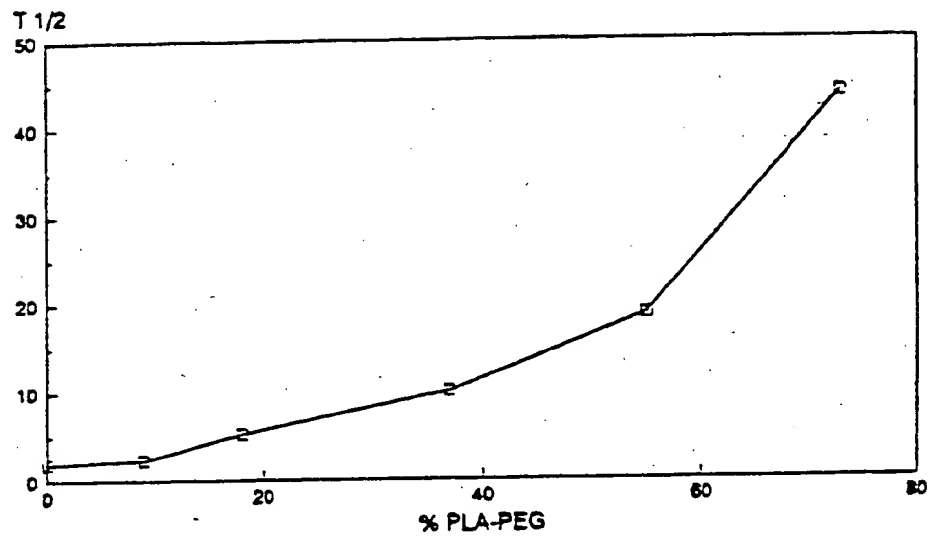
n est compris entre 20 et 150

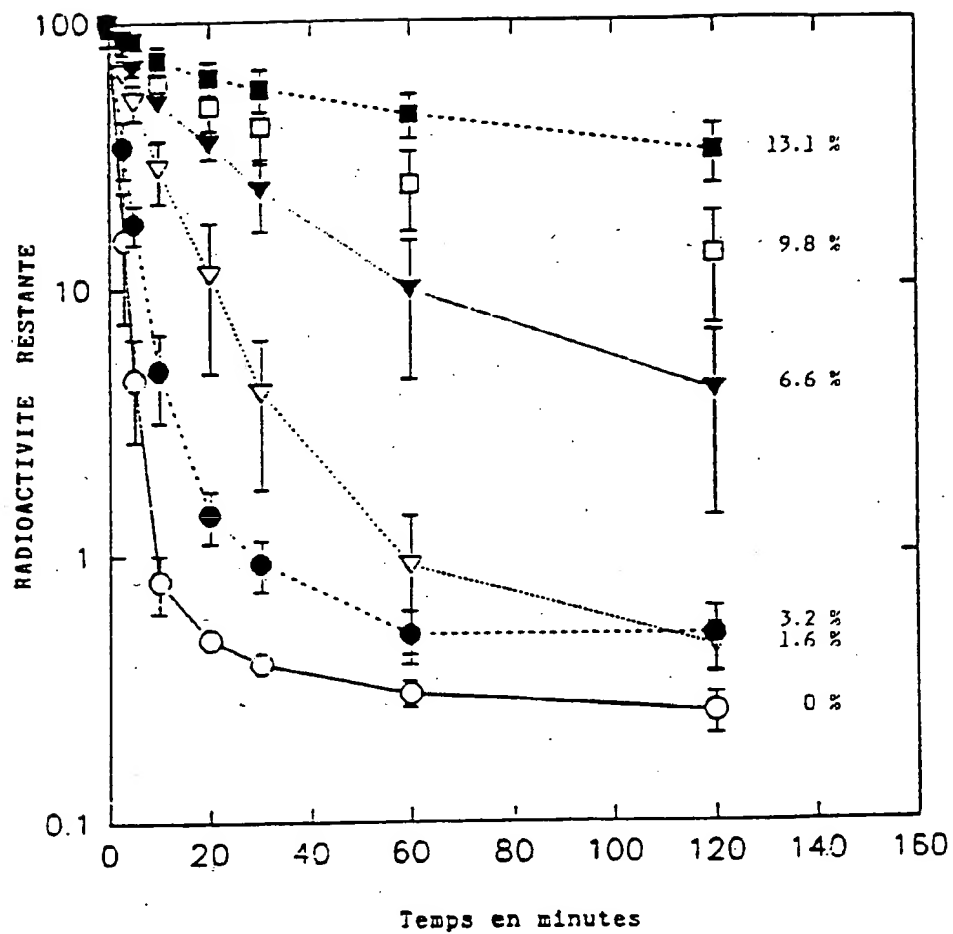
m est compris entre 10 et 150.

- 5 - Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisées en ce qu'elles présentent une dimension moyenne comprise entre 50 et 500 nm

- 6 - Nanoparticules selon la revendication 5 caractérisées en ce qu'elles présentent une dimension moyenne comprise entre 50 et 250 nm.

- 7 - Utilisation des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes en pharmacie humaine ou animale ou en diagnostic médical (imagerie).







Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 40 1788

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	WO-A-7 800 011 (GARCHING) * Revendications 1-2,4; page 3, lignes 4-20; page 5, lignes 19-30; page 6, lignes 1-2; page 11, exemple 6 *	1,7	A 61 K 31/765 A 61 K 9/51 A 61 K 47/34
A	STN INTERNATIONAL INFORMATION SERVICES BASE DE DONNEES: CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 113, no. 18, abrégé no. 153222a, Columbus, Ohio, US; P. ARTURSSON et al.: "Preparation of sterically stabilized nanoparticles by desolvation from graft copolymers", & J. POLYM. SCI., PART A: POLYM. CHEM., 1990, 28(10), 2651-63 * Abrégé *	1,7	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 20-08-1992	Examinateur SCARPONI U.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date du dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-breve P : document intercalaire			

EPO FORM 150 (01.92) (P0407)